Ueber die Einwirkung von Resorcin und Ameisensäure auf Seidenfibroin

---

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

genehmigt von der Philosophischen Fakultät

der

Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Berlin

von

Irene Weindling
aus Krakau.

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 1931
Tag der Promotion: 25. Juli 1932.

Druck von Gebr. Hoffmann, Berlin-Charlottenburg, Schillerstraße 44

432

Referenten: Prof. Dr. Schlenk

Prof. Dr. Bodenstein.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Ueber die Einwirkung von Resorcin und Ameisensäure auf Seidenfibroin.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533918_0096

Theoretischer Teil.

In der vorliegenden Arbeit werden hauptsächlich einige Fragen Fragen verfolgt, die für die Erkenntnis der Vorgänge bei der Einwirkung von Resorcin und Ameisensäure auf Seidenfibroin wesentlich sind.

R. O. Herzog und Kobel [1]) haben vor einigen Jahren gefunden, daß Seidenfibroin sich in geschmolzenem Resorcin auflöst. Als die Lösungen kryoskopisch untersucht wurden, ergaben sich Molekulargewichte etwa um 300. R. O. Herzog und Hans Cohn [2]) haben dann Lösungen von Produkten, die durch 14 stündiges Erwärmen des Seidenfibroins in Resorcin erhalten worden waren, in Resorcinwasser 1 : 1, hergestellt und diese Lösungen gegen das Lösungsmittel diffundieren lassen; aus dem Diffusionskoeffizienten ergab sich wiederum eine geringe Teilchengröße, nämlich ein Molekulargewicht von rund 325.

Wenn ein Protein von Polypeptidcharakter durch Resorcin gespalten werden sollte, so müßte es sich jedenfalls um eine andersartige Reaktion als um eine katalytische Hydrolyse handeln, wie es die Einwirkung von Säuren, Alkali oder Fermenten auf wässerige Proteinlösungen ist. Wohl könnte man eine Hydrolyse für möglich halten, da ja an sich für die Reaktion selbst nur sehr geringe Wassermengen notwendig wären, die als Adsorptionswasser oder auf eine andere, noch unbekannte Weise so an das Fibroin gebunden sein könnten, daß sie auch bei sorgfältiger Vortrocknung nicht abgegeben werden. Aber es gibt noch eine Reihe von anderen Möglichkeiten, die einen Zerfall des Fibroins bei der erwähnten Reaktion erklären könnten.

---

1) R. O. Herzog u. Kobel: Proteinstudien II, Hoppe-Seylers Ztschr. f. physiol. Chemie Bd. 134, 1924.

2) Inaugural-Dissertation von Hans Cohn 1929.

Dasselbe gilt für den Einfluß der Ameisensäure auf das Fibroin.

Im ersten Abschnitt ist versucht worden, mit Hilfe der Absorption im Ultraviolett zu prüfen, ob Resorcin von dem Naturprodukt gebunden wird. Die Wahrscheinlichkeit, auf diesem physikalischen Wege zu einem Ergebnis zu kommen, war nicht ganz gering, da ja die Benzolabkömmlinge durch sehr charakteristische Absorptionsbanden neben aliphatischen Resten hervortreten können. Versuche solcher Art an synthetischen Polypeptiden, die nicht veröffentlicht worden sind, hat eben vor dem Kriege R. O. Herzog mit einigen Mitarbeitern angestellt; seit einer Reihe von Jahren hat E. Abderhalden [3]) Absorptionskurven veröffentlicht, die das oben angegebene Resultat ebenso erkennen lassen. Trotz-, dem Tyrosin im Seidenfibroin vorhanden ist, sollte ein Unterschied zwischen Seidenfibroin, das nicht, kurz oder lang mit Resorcin behandelt war, zu beobachten sein.

Die Auflösung des Fibroins wurde nach dem Beispiel von R. O. Herzog und Kobel durch schnelles Auflösen in starker Salzsäure und sofortiger Neutralisation mit einer bestimmten Menge Natronlauge erhalten. Leider war das Resultat dieser Versuche nicht eindeutig, weil eine Verfärbung der Lösung, die mit der Einwirkung des Resorcins im Zusammenhang steht, nicht vermieden werden konnte. Es war also ein charakteristischer Unterschied der Absorptionsbanden schon im sichtbaren Gebiet vorhanden, so daß sich einfache Schlüsse nicht ziehen ließen.

Im zweiten Teil der Arbeit sind Versuche enthalten, die eine systematische Analyse der Stickstoffverteilung im Zusammenhang mit der Einwirkung von Resorcin darstellt. D. h., es wurden die auf verschiedene Weise gebundenen Stickstoffmengen: Amino-, Amid- und Huminstickstoff im Verhältnis zum Gesamtstickstoff untersucht. Weiter wurde das Verhältnis des Aminostickstoffs zum Gesamtstickstoff festgestellt, das bei der Säurespaltung verschieden vorbehandelter Präparate im gelösten Anteil gefunden wurde.

---

3) E. Abderhalten u. Richard Haas: Ztschr. f. physiol. Chemie Bd. 74, S. 505, 1911.

Diese Untersuchungsmethode ergab bemerkenswerte Resultate. Vergleicht man das Verhältnis: $\frac{\text{Aminostickstoff}}{\text{Gesamtstickstoff}}$ von nicht vorbehandeltem Seidenfibroin und von einem eine Stunde mit Resorcin behandelten Präparat zu verschiedenen Zeiten, wenn man auf beide Salzsäure bei 0° einwirken läßt, so findet man ein sehr ähnliches Verhalten. In den beiden ersten Tagen ist die Abspaltung von Aminoverbindungen nicht nachweisbar, erst dann tritt sie in geringem Maße ein, immerhin zeigt das vorbehandelte Präparat etwa nach 90 Stunden einen höheren Wert (5%) als das native Fibroin (2%); nach 140 Stunden ist dieser Unterschied noch deutlicher, er beträgt 7% gegen 2%.

Bei höherer Temperatur (39°) findet man ein ähnliches Ergebnis: das native Präparat hat nach 40 Stunden nur 5% abgespalten (Spaltkurve 5, S. 38); die 20 Minuten, 1 Stunde und 6 Stunden lang vorbehandelten Präparate 10—12% (Spaltkurven 8, 9, 10, Seite 38).

Auch nach Behandlung des Fibroins und seines 1 Stunden-Resorcinpräparates mit Ameisensäure zeigt sich eine leichtere Angreifbarkeit durch Säure, die aber größer ist, als die bei bloßer Behandlung mit Resorcin, wie aus den Spaltkurven 6 und 7 S. 38, 11 (S. 38), 12 (S. 38) ersichtlich ist. Man sieht an den Kurven, daß eine leichtere Angreifbarkeit durch die Säure als Folge der Resorcinvorbehandlung und der Einwirkung der Ameisensäure nachweisbar ist, daß aber die Dauer der Einwirkung bei dem jeweiligen Agens nicht wesentlich verschiedene Folgen hat.

Sehr auffällig ist der Verlauf der Kurven. Man findet diese nämlich nicht stetig gekrümmt, sondern sie zeigen scharf ausgeprägte Stufen. Solche Haltepunkte liegen bei dem nicht vorbehandelten Seidenfibroin bei dem Verhältnis $\frac{\text{Aminostickstoff}}{\text{Gesamtstickstoff}}$ 2,5, wenn es bei 0° der Säureeinwirkung ausgesetzt ist; bei 5%, wenn die Temperatur 39° beträgt. Im ersten Fall beträgt die Einwirkungsdauer 80 Stunden, bis 2% gefunden werden; bei dieser Zahl bleibt es wieder 80 Stunden. Die Steigung auf 5% tritt in 20 Stunden ein und an diesem Punkt ändert sich mehr als 200 Stunden lang so gut wie nichts.

Bei 39° geht die Spaltung bis zu 5% in den ersten 20 Stunden vor sich, dann bleibt der Aminostickstoffwert 260 Stunden konstant.

Ganz ähnlich sind die Ergebnisse bei den Resorcin-Fibroinpräparaten. Die je nach Dauer der Einwirkung nach mehr oder weniger langer Zeit erreichten 13% Aminostickstoff ändern sich in 130, 150, 180 Stunden praktisch nicht.

Das Ergebnis ist nicht wesentlich anders beim Seidenfibroin, das in starker Ameisensäure, einem bekannt guten Quellungsmittel, vorbehandelt wurde. Die Stufen liegen bei etwa 2 und 8%.

Bei dem kombiniert in Resorcin und Ameisensäure behandelten Präparat, das von allen beobachteten die stärkste Einwirkung ergab, scheinen die Stufen bei etwa 14 und 35% zu liegen.

Es liegt zunächst nahe anzunehmen, daß den „Stufen": 2, 5, 8, 13, 35 eine chemische Bedeutung zukommt, also hier Stellen im Molekül sind, wo das Reagens besonders schnell einwirkt, während die Reaktionsgeschwindigkeit sonst sehr gering ist. Es erscheint aber nicht möglich, eine Entscheidung gegenüber der andern Alternative zu treffen, daß es sich nämlich um eine physikalische Einwirkung, ein Auflösen nach Vorquellung, handelt. Der Erfahrung, die man bisher bei der Säure- oder Fermenthydrolyse gelöster Proteïne gemacht hat, entspricht diesem Verhalten jedenfalls nicht, so daß die Annahme, daß eine Folge der spezifischen Struktur des Seidenfibroins vorliegt, als wahrscheinlich anzunehmen ist.

Im Bereiche der hier geprüften Reaktionsdauer, ist der Beweis eines chemischen Einflusses nicht erbracht, auf keinen Fall ist ein erheblicher chemischer Abbau durch die Behandlung mit Resorcin resp. Ameisensäure bis zu 6 Stunden eingetreten.

Im folgenden werden zunächst die Darstellungsweisen der Fibroinpräparate beschrieben: Experimenteller Teil 1. Im 2. Teil des experimentellen Abschnittes folgt die Beschreibung der verwendeten Methoden. Im 3 .Teil sind die Resultate der Absorptionsmessungen, die analytischen Daten der Stickstoffverteilung und die genaue Beschreibung des Abbaues angegeben, die zu den oben beschriebenen Ergebnissen geführt haben. In einem 4. Abschnitt sind noch einige analytische Beobachtungen mitgeteilt, die zur Kontrolle und Ergänzung gesammelt wurden. Endlich sind im 5. Teil Versuche an einem synthetisch gewonnenen Tetrapeptid, dem Triglycylglycin, mitgeteilt, die zum Vergleich mit dem Seidenfibroin verwendet wurden. — In der Zusammenfassung sind die direkten Versuchsergebnisse niedergelegt.

Experimenteller Teil.

1. Teil. **Darstellung der Fibroinpräparate.**

a) Entbastung der Tussahseide.

Zur Untersuchung des Einflusses von Resorcin bezw. Ameisensäure auf das Seidenfibroin wurde Tussahseide, Seide wilder Eichenspinner, als Ausgangsmaterial benutzt. Nachdem gröbere Verunreinigungen entfernt wurden, wurde die Seide enbastet, d. h. von Sericin, dem Seidenleim, durch Behandlung mit neutraler Seife befreit. Zu diesem Zweck wurde eine Seifenlösung aus Marseiller Seife hergestellt, die 30 Teile Seife auf 100 Teile Seide enthielt, und die Seide darin während 2 Stunden bei einer Temperatur von 90—95 ^{0} behandelt. Diese Entbastung wurde dreimal wiederholt, um das Sericin vollständig zu entfernen. Zum Schluß wurde die Seide sorgfältig mit warmem, destilliertem Wasser unter Zusatz von Essigsäure ausgewaschen, darauf solange noch mit reinem Wasser gespült, bis das Waschwasser keine Opalescenz mehr zeigte. Danach wurde das Fibroin abgepreßt und vom größten Teil des Wassers durch Trocknen im Trockenschrank befreit und schließlich bis zur Gewichtskonstanz über Phosphorpentoxyd im Vacuum bei 100 ^{0} zur Entfernung anhaftender Feuchtigkeit erwärmt. Das Fibroin wurde im Vacummexsikkator über Phosphorpentoxyd aufbewahrt, da es begierig Feuchtigkeit aus der Luft aufnimmt.

b) Darstellung der Resorcinpräparate des Seidenfibroins.

Aus dem Seidenfibroin wurden durch Variation der Einwirkungsdauer 3 Fibroin-Resorcinpräparate auf die von Herzog und Kobel [4]) beschriebene Weise dargestellt.

---

4) R. O. Herzog u. M. Kobel, Ztschr. f. physiol. Chemie Bd. 134, S. 24.

Das sorgfältig getrocknete Fibroin wurde mit geschmolzenem, wasserfreiem Resorcin behandelt. Für die Schmelze wurde das Resorcin albissimum resublimatum von Riedel verwendet. 50 g Fibroin wurden jeweils in 1000 g geschmolzenes Resorcin bei 120° schnell eingetragen und zwecks Feuchtigkeitsausschluß unter Quecksilberverschluß kräftig gerührt, wobei das Fibroin nach vorheriger Quellung unter gelb-braun-Färbung in Lösung ging.

Zur Darstellung des Präparates A behandelte man das Fibroin auf diese Weise 20 Minuten, darauf wurde während weiterer 5 Minuten die Temperatur auf 140° gesteigert. Dann wurde die Schmelze in eisgekühltes Methanol eingegossen, wobei eine stark gequollene grau-grüne Substanz ausfiel, die die Faserstruktur des Ausgangsmaterials vollständig verloren hatte. Sie wurde abzentrifugiert und bis zur völligen Resorcinfreiheit mit Methanol und Aether im Soxhlet extrahiert. Auf Resorcinfreiheit wurde mit Eisenchlorid und Phtalsäureanhydrid geprüft. Die Substanz A wurde ebenso wie die Präparate B und C im Vacuum über Phosphorpentoxyd bei Zimmertemperatur getrocknet und im Achatmörser zu einem Pulver mit stark elektrischen Eigenschaften zerrieben.

Ein zweites Präparat, das Präparat B, wurde auf ähnliche Weise dargestellt. Zum Unterschied von A wählte man eine Einwirkungsdauer von 1 Stunde, ohne nachherige Steigerung der Temperatur auf 140°.

Zur Darstellung des dritten Präparates schließlich, des Präparates C, wurde die Versuchsdauer auf 6 Stunden gesteigert.

Es wurde versucht, die grau-grünen Resorcinpräparate mittels Tierkohle und durch milde Reduktionsmittel wie Natrium-Hyposulfit zu entfärben. Diese Versuche fielen negativ aus. — Ob diese Färbung auf eine Verbindung des Fibroins mit dem Resorcin beruht, oder ob es sich um stark färbende Spuren eines ätherartigen Kondensationsproduktes des Resorcins handelt, das sich bei Anwesenheit des Luftsauerstoffs bildet, wurde nicht festgestellt.

Es wurde versucht, das Fibroin in Stickstoffatmosphäre zu schmelzen; dabei erhielt man zunächst ein farbloses Präparat; dieses färbte sich aber beim Aufbewahren schwach gelb und gab in salzsaurer Lösung eine ebenso intensive Gelbfärbung, wie das in Gegenwart des Luftsauerstoffs dargestellte Präparat, trotz erheblich schwächerer Färbung des Ausgangsmaterials im festen Zustande.

Wie später gezeigt wird, unterschieden sich diese gefärbten Seidenpräparate von dem nativen Seidenfibroin nicht im Stickstoffgehalt, während ein mit Resorcin in Luftatmosphäre behandeltes Polypeptid, das Triglycylglycin, eine Rotfärbung und eine Abweichung des Stickstoffwertes von ungefähr 1% zeigte.

Die gepulverten Resorcinpräparate des Fibroins wurden bis zur weiteren Untersuchung über Phosphorpentoxyd im Vacuumexsikkator aufbewahrt.

c) Behandlung des Seidenfibroins und des aus ihm gewonnenen 1 Stunden-Resorcin-Präparates mit Ameisensäure.

Die Ameisensäure ist neben anderen organischen Säuren als Lösungsmittel resp. Quellungsmittel für Proteïne bekannt. Baumann und Diesser [5]) verwendeten sie zur Lösung des Fibroins zwecks Herstellung lackähnlicher und wasserbeständiger Ueberzüge. Nach der Angabe der Verfasser erfährt das Fibroin bei der Behandlung mit Ameisensäure in der Kälte keine Veränderung. In der Wärme tritt eine Spaltung ein, und bei zu langer Behandlung in der Kälte erhält man beim Verdunsten der Säure einen Rückstand, der zur Sprödigkeit neigt.

Für die vorliegende Arbeit war das Verhalten des Fibroins und seines Resorcinpräparates nach schonender Behandlung mit Ameisensäure von Interesse. Zu diesem Zweck wurde sowohl das Seidenfibroin, wie sein 1 stündiges Resorcinpräparat mit Ameisensäure in folgender Weise behandelt: Es wuurden jeweils 10 g Substanz in 1 Liter 95%iger reinster Ameisensäure bei 0° eingetragen und mittels eines Rührers mit Quecksilberverschluß, während der Dauer des Versuches kräftig gerührt. Dabei zeigte das Fibroin eine starke Quellung, verlor seine Faserstruktur und bildete nach 1 stündiger Behandlung eine gelatinöse Masse, ohne völlig in Lösung zu gehen, wie Diesser und Baumann es angeben [6]). Nach 1 Stunde wurde die Masse in einen Ueberschuß von Methanol bei 0° eingegossen, wobei die Quellung momentan zurückging, und das Fibroin wieder in Faserform ausfiel. Es wurde auf einer Porzellannutsche abgesaugt, mit Alkohol-Aether bis zum Verschwinden der Säurereaktion

5) Syvern: Künstliche Seide, Baumann u. Diesser S. 440.

6) Syvern l. c.

extrahiert, über Phosphorpentoxyd bei 78° im Vacuum getrocknet und im Exsikkator über Phosphorpentoxyd aufbewahrt.

Weitere 10 g Fibroin wurden unter gleichen Bedingungen und gleicher Nachbehandlung, bei einer Versuchsdauer von 6 Stunden, der Einwirkung von Ameisensäure überlassen. Das Fibroin war nach der Behandlung mit Ameisensäure sehr spröde geworden.

Ebenso wurde das Resorcinpräparat B (1 Stunde) behandelt: 10 g 1 Stunde lang und weitere 10 g 6 Stunden lang. Das hellgrüne Präparat löste sich dabei mit goldgelber Farbe in Ameisensäure, fiel beim Eingießen in Methanol gequollen aus und wurde nach dem Abzentrifugieren auf die oben beschriebene Weise bis zum Verschwinden der Säurereaktion extrahiert, getrocknet, nochmals im Achatmörser gepulvert und über Phosphorpentoxyd aufbewahrt.

2. Teil. **Die Untersuchungsmethoden.**

a) Die Absorption im Ultraviolett.

Es wurden Absorptionsspektren von nativer Seide, vom Seidenfibroin, das 6 Stunden mit Ameisensäure vorbehandelt war, und vom 6-Stunden-Resorcin-Fibroin-Präparat hergestellt.

Zu diesem Zweck wurden 0,1 und 0,01%ige Lösungen auf folgende Weise bereitet: Es wurden jeweils 0,2—0,3 g über Phosphorpentoxyd bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Substanz gewogen, und hiervon eine 2%ige Lösung in 37%iger reinster Salzsäure hergestellt. 20 ccm dieser Lösung wurden in genau titrierte, 11 12 normale Natronlauge vorsichtig eingetropft. Von der Natronlauge wurde soviel vorgelegt, daß die Lösung gerade noch alkalisch blieb, um ein Koagulieren der Seide zu vermeiden. Diese schwach alkalischen Lösungen wurden auf 0,1%ige bezw. 0,01%ige mit über Kaliumpermanganat destilliertem Wasser verdünnt, und ihre Absorptionskoeffizienten nach der Henrischen[7]) Methode der Vergleichsspektren bestimmt. Die Schichtdicken variierten zwischen 2—75 mm, die Belichtungszeiten zwischen 10 und 90 Sekunden für die Lösungen; das reine Lösungsmittel, das aus 37%iger Salzsäure und der Natronlauge durch entsprechende Verdünnung mit Wasser hergestellt wurde, wurde stets nur 5 Sekunden lang belichtet.

7) Henri, Etudes de Photochemie, Paris 1919.

In den Kurven 1—3 sind die Absorptionen graphisch dargestellt. Als Abszissen dienten die den Stellen gleicher Schwärzung entsprechenden reziproken Werte für die Wellenlängen in A. E. multipliziert mit 10^7 als sogen. Schwingungszahlen; als Ordinate der dekadische Logarithmus, des auf Gewichtsprozente bezogenen Extinktionskoeffizienten E. In den Tabellen 1—3 (S. 23—25) sind die Schwingungszahlen und die Werte für lg.E eingetragen.

Die einzelnen Größen stehen im folgenden Verhältnis zueinander:

1. $$\frac{J}{J_0} = 10^{-k \cdot d}$$

wobei J_0 = Intensität des eintretenden Lichtes,
J = Intensität des austretenden Lichtes,
K = Absorptionskoeffizient,
d = Schichtdicke bedeuten.

Intensität und Schichtdicke stehen nach dem Bunsen-Roscoeschen Gesetz im umgekehrten Verhältnis zueinander:

$$\frac{J_0}{J} = \frac{t}{t_0}$$

Also ist:

2. $$\frac{t_0}{t} = 10^{-k \cdot d}$$

und:

3. $$k \cdot d = \lg \frac{t}{t_0}$$

woraus

$$k = \frac{1}{d} \cdot \lg \frac{t}{t_0}$$

sich ergibt. Aus k berechnet sich der prozentuale Extinktionskoeffizient E.

$$E = \frac{k}{s} \quad \text{oder} \quad \lg E = \lg k - \lg s,$$

wo s Gramme im Liter bedeuten.

Im 3. Teil des experimentellen Abschnittes sind die Resultate der Absorptionen im Ultraviolett angegeben.

b) Die Stickstoffverteilung.

Die Untersuchung der Stickstoffverteilung im Fibroin vor und nach Behandlung mit Resorcin und Ameisensäure wurde in Anlehnung an die Methode von Donald van Slyke vorgenommen [8]).

Die Methode von van Slyke unterrichtet über 98—100% des Stickstoffgehaltes der Substanzen nach vollständiger Hydrolyse in 20%iger Salzsäure, erlaubt den Verlauf der Hydrolyse zu verfolgen und gibt Auskunft über folgende Produkte im Hydrolysat:

1. Ammoniak- oder Amidstickstoff,
2. Melaninstickstoff,
3. Arginin-, Histidin-, Lysin- und Zystin-Stickstoff, durch Fällung mittels Phosphorwolframsäure,
4. Aminostickstoff der Gruppe der primären Monoaminosäuren,
5. den Nichtaminostickstoff von nicht mit Phosphorwolframsäure fällbaren Substanzen.

Die Fällung mit Phosphorwolframsäure konnte unterbleiben, da nach E. Abderhalden [9]) die Hexonbasen in der Seide nur in sehr untergeordnetem Maße vorkommen. Aus einem Kilogramm Seide konnten 1,5 g Arginin, 0,85 g Lysin und 0,75 g Histidin isoliert werden, also wären in den 2—3 g Substanz, die jeweils analysiert wurden, nur Spuren dieser Aminosäuren vorhanden. Das Zystin kommt in der Seide überhaupt nicht vor.

Darum beschränkten sich die Analysen auf die Bestimmung 1. des Gesamtstickstoffs, 2. des Ammoniakstickstoffs, der aus den Dikarbonsäuren: Glutamin- und Asparaginsäure stammt, von denen man annimmt, daß sie im Eiweißmolekül in Form von Säureamidradikalen gebunden sind [10]), 3. des Aminostickstoffs und 4. des Huminstickstoffs.

Die Analysen wurden also in folgender veränderter Form ausgeführt:

2—3 g Substanz wurden in 20 Teilen 20%ige Salzsäure eingebracht und in einem tarierten Schliffkolben gekocht. Zunächst

8) Abderhaldens Handbuch der biol. Arbeitsmethoden, Teil 7, Heft 1, S. 53. Donald van Sylke: Die Stickstoffverteilung.

9) E. Abderhalden, Ztschr. f. physiol. Chemie Bd. 120, S. 207, 1922.

10) Denis: Amide Nitrogen in Proteins, Journ. of Biol. Chem. S. 365.

wurde der Hydrolysenverlauf geprüft. Nach Ablauf $^1/_2$ Stunde wurde die Hydrolyse unterbrochen, die Lösung gekühlt, und das Kölbchen vor und nach Entnahme von 2 ccm bei Zimmertemperatur gewogen. Die auf 10 ccm verdünnte Probe wurde durch eine Mikro-Slyke-Bestimmung auf ihren Aminostickstoffgehalt untersucht, wobei jeweils 1—2 ccm der verdünnten Lösung gebraucht wurden. Bei dieser Bestimmung wurde stets die gleiche Dauer von 10 Minuten innegehalten, da bei verschiedener Versuchsdauer leicht durch das Ammoniak des Amidstickstoffs abweichende Werte auftreten. Nach Entnahme der Probe für die Aminostickstoffbestimmung aus dem Hydrolysengemisch wurde die Hydrolyse $1^1/_2$ Stunden fortgesetzt, und nach Ablauf dieser Zeit wieder eine Probe auf die vorhin beschriebene Weise für eine Aminostickstoffbestimmung entnommen. Durch Wägung des Kölbchens vor dem Abpipettieren wurde jedesmal die Konzentration der Lösung festgestellt, und eine Korrektur für die Zunahme an Fibroin, durch teilweise Verdampfung des Lösungsmittels, angebracht. Die Hydrolyse wurde weitere $2^1/_2$ Stunden fortgesetzt und ergab noch immer steigende Aminostickstoffwerte. Nach einer weiteren Stunde, also nach insgesamt 6 Stunden, stellte sich schließlich ein konstant bleibender Wert ein. Es wurde noch einmal nach 24 und 30 Stunden (vom Anfang der Hydrolyse gerechnet) gemessen. Die Werte zeigten Abweichungen innerhalb der Fehlergrenze. Die für den Verlauf der Hydrolyse gefundenen Werte und die Kurve des Verlaufes befinden sich bei der Zusammenstellung der Analysenwerte für die Stickstoffverteilung: S. 28.

In der Folge wurde dann so verfahren, daß man die Hydrolyse 30 Stunden vor sich gehen ließ und erst nach Ablauf dieser Zeit eine Aminostickstoffbestimmung ausführte.

Nach vollständiger Hydrolyse wurde der Amidstickstoff durch eine Ammoniak-Destillation unter Vorsichtsmaßregeln, die nachstehend beschrieben werden, bestimmt. Der Amidstickstoff ist gewöhnlich gleich demjenigen der Dikarbonsäuren: Glutamin- und Asparaginsäure.

Um jede Beeinflussung der anschließenden Bestimmungen durch noch zurückbleibendes Ammoniak zu vermeiden, muß die Destillation von Ammoniak vollständig sein. Die Schwierigkeit der Ausführung liegt darin, daß die Behandlung mit Alkali sehr vorsichtig ausgeführt werden muß, damit die verschiedenen Aminosäuren vom

Alkali nicht angegriffen werden. Aus diesem Grunde wird die Destillation bei 40—50° ausgeführt. Zunächst wird das gewogene Hydrolysat bei vermindertem Druck konzentriert bis alle Salzsäure vertrieben ist, dann wird das eingeengte Hydrolysat quantitativ in einen Claisenkolben gespült und zur Bestimmung des Ammoniaks, unter Zusatz von 10%iger Kalkhydratsuspension bis zur alkalischen Reaktion, unter vermindertem Druck bei 40—50° in eine Vorlage destilliert, in der sich 30 ccm n 10 Schwefelsäure befanden. Zur Vermeidung des Schäumens während der Destillation reichte die vorgeschriebene Menge von 100 ccm Alkohol nicht aus. Die erwünschte Wirkung wurde durch Zugabe einiger Tropfen Oktylalkohol erreicht. Um ein Mitreißen der vorgelegten Säure in die Vacuumleitung zu verhindern, wurde ein Sicherheitskolben mit 20 ccm n/10 Salzsäure an den ersten angeschlossen, an diesen noch ein dritter Kolben mit destilliertem Wasser zum Auffangen der mitgerissenen Säure und dieser schließlich mit der Vacuumleitung verbunden.

Nach Beendigung der Destillation wurde der Inhalt der drei vorgelegten Kolben quantitativ in einen Erlenmeyer gespült und mit n/10 Natronlauge zurücktitriert.

Während der Ammoniak-Destillation wurden die bei der Hydrolyse entstandenen Melanine (beim Fibroin aus Tyrosin) durch den ungelösten Kalk adsorbiert. Zur Bestimmung der Melanine wurde der Destillationsrückstand durch ein Faltenfilter filtriert, und Filter mit Rückstand einer Kjeldahlbestimmung unterworfen. Zum Aufschluß wurden 35 ccm Schwefelsäure gebraucht (konzentrierte Schwefelsäure mit 7% Anhydrid für Kjeldahlbestimmung von Kahlbaum). Als Katalysatoren wurden Kupfer- und Quecksilbersulfat verwendet. Auf Vollständigkeit des Aufschlusses wurde mittels Kaliumpermanganat geprüft. Der Aufschluß wurde in Gegenwart eines Ueberschusses von Kaliumsulfidlösung und Kaliumhydroxyd — 1,30 für Kjeldahlbestimmungen von Kahlbaum — destilliert, das Ammoniak in n/10 Schwefelsäure aufgefangen und mit n/10 Natronlauge zurücktitriert.

Der Gesamtstickstoffgehalt der Substanzen wurde jeweils durch Kjeldahlbestimmungen oder Mikro-Dumas-Bestimmungen ermittelt, sein Wert = 100 gesetzt und auf ihn die Werte für Amid-, Amino- und Melanin-Stickstoff bezogen.

Das Fibroin selbst und das mit Ameisensäure behandelte Fibroin wurden mittels der Makro-Kjeldahl-Methode untersucht. Diese Substanzen besitzen Faserstruktur, und daher ist es sehr schwierig, ohne Verluste mit ihnen Mikrobestimmungen auszuführen, zu denen 3—5 mg verwendet werden.

Bei den 3 Resorcinpräparaten des Fibroins und dem mit Ameisensäure behandelten Präparat wurde der Gesamtstickstoffgehalt durch die Mikro-Dumas-Methode nach Pregl [11]) festgestellt.

Während die Mikro-Dumas-Methode genau nach der Vorschrift von Pregl ausgeführt wurde, wobei beim Verbrennen von Leucin die Werte 10,56; 10,58 und 10,75% gefunden wurden, die vom theoretischen Stickstoffwert: 10,70 um —0,14; —0,12 und + 0,05% abwichen, wurde die Kjeldahlmethode zwecks Erhöhung der Genauigkeit abgeändert.

Zum Aufschluß des Fibroins wurden in üblicher Weise 0,1 bis 0,2 g Substanz, 20 ccm konz. Schwefelsäure für Kjeldahlbestimmungen, 10 g Kaliumsulfat für Kjeldahlbestimmungen und ca. 1 g Quecksilbersulfat verwendet. Zunächst wurde das Gemisch im Kjeldahlkolben auf einem Asbestdrahtnetz über ganz kleiner Flamme 1/2 Stunde lang erwärmt, um eine Kohleausscheidung zu vermeiden, dann eine Stunde bei starker Flamme. Nach Ablauf dieser Zeit war der Aufschluß klar. Nach dem Erkalten wurde in Anlehnung an die Mikrokjeldahlbestimmung von Pregl 1 ccm absoluter Alkohol und 10 g konzentrierte Schwefelsäure zugefügt, wieder zunächst über kleiner Flamme, dann über starker Flamme erhitzt, wobei eine voluminöse Kohlenausscheidung eintrat. Nach 3 Stunden war der Aufschluß beendet, und jetzt wurde zur völligen Oxydation Kaliumpermanganat in drei Portionen zugefügt. Nach jeder Zugabe wurde abgewartet, bis der Aufschluß wieder klar wurde. Nach Zugabe der letzten blieb der Aufschluß gefärbt und nach dem Erkalten der Destillation unterzogen.

Diese wurde stark abgeändert. Die Apparatur bestand aus einem Wasserdampfentwickler, von dem ein Glasrohr zu einem Tropftrichter mit Dreiwegehahnregulierung führte, sodaß eine Verbindung zwischen Dampfentwickler und Kjeldahlkolben oder Tropftrichter und Kjeldahlkolben hergestellt werden konnte. Der Trichter

11) Pregl: Die Mikro-Analyse.

war mit dem Kjeldahlkolben durch ein Glasrohr verbunden, das bis auf den Boden des Kolbens reichte. Vom Kjeldahlkolben führte wie üblich ein Destillationsrohr mit Kühler in die Vorlage. Der Dampfentwickler enthielt Zinkstaub. In den Tropftrichter, der schräg mit dem Dampfentwickler und Kjeldahlkolben derart verbunden war, daß sein Inhalt nur in den Kjeldahlkolben fließen konnte, wurden 220 ccm 30%iger Natronlauge oder Kalilauge für Kjeldahl- und 5%ige Natriumthiosulfatlösung eingefüllt. Von der letzteren wurde jeweils die Menge genommen, die Schwefel in dreifachem Aequivalentgewicht des in Form von Quecksilbersulfat verwendeten Quecksilbers enthielt. Sie diente zur Fällung des Quecksilbers als Quecksilbersulfid vor der Destillation, damit durch Bildung von Oxymercuriamoniumverbindungen die Bestimmung nicht gestört würde. — In die Vorlage kam n/10 Schwefelsäure.

Nach dem Erkalten und Verdünnen des Aufschlusses auf 400 ccm wurde der Aufschluß und das Wasser im Dampfentwickler zum Sieden erhitzt, um das Gemisch von Natronlauge und Natriumthiosulfatlösung zum Aufschluß zugelassen, wobei noch etwas Lösung im Tropftrichter zurückblieb, damit das entwickelte Ammoniak auf diesem Wege nicht entweichen konnte. Es wurde jetzt solange destilliert, bis die Flüssigkeitsmenge in der Vorlage 100 ccm zugenommen hatte und wie üblich mit n/10 Natronlauge zurücktitriert.

Für Alanin, das theoretisch einen Stickstoffgehalt von 15,7% hat, wurden auf diese Weise Werte von 15,77 und 15,65% gefunden, also betrug der Fehler im ersten Falle −0,07%, im zweiten Falle −0,05%.

c) Messung des Hydrolysenverlaufes.

Als dritte Vergleichsmethode zwischen dem nativen Fibroin und den aus ihm gewonnenen Produkten wurde die Untersuchung der Aminostickstoff-Spaltungsgeschwindigkeit gewählt.

Für die Untersuchungen wurden ca. 2%ige Lösungen der Substanzen in rauchender Salzsäure hergestellt. Ca. 2 g Substanz wurden zu diesem Zweck in 98 g 37%iger reinster, rauchender Salzsäure unter Eiskühlung im Erlenmeyerkolben mit Schliffstöpsel gelöst. Die Lösungen waren zunächst hellviolett. Nach längerem Stehen vertiefte sich die Farbe immer mehr, bis die Lösungen nach 3—4 Tagen braune Farbe annahmen.

Nach dem Lösen unter Eiskühlung und kräftigem Umschütteln wurden jeweils 5 ccm abpipettiert und gewogen. Aus diesem Gewicht wurde dann der Substanzgehalt der analysierten Lösung berechnet. Nun wurden die Lösungen in einem Thermostaten bei 39° aufbewahrt und nach der Van-Slyke-Methode auf Aminostickstoff geprüft.

Die Van-Slyke-Methode.

Die Aminostickstoffanalyse von van Slyke [12]), nach welcher der Verlauf der Hydrolyse von Fibroin in 20%iger Salzsäure in der Siedehitze, der Gehalt an Monoaminosäuren nach vollständiger Hydrolyse der Substanzen und schließlich ihre Aminostickstoffspaltung bei 39° untersucht wurde, beruht auf der seit längerem bekannten Reaktion zwischen Aminosäuren und salpetriger Säure nach der Gleichung:

$$\begin{matrix} RCHCOOH \\ | \\ NH_2 \end{matrix} + HNO_2 = \begin{matrix} RCHCOOH \\ | \\ OH \end{matrix} + H_2O + N_2.$$

Es muß beachtet werden, daß Körper, welche eine Glycylgruppe am Anfang tragen, also mit dem NH_2 dieser Gruppe reagieren, einen etwas zu hohen Stickstoffgehalt zeigen, der aber durch rechnerische Korrektur mit einem Faktor (0,8) eliminiert werden kann [13]). Die Abweichung wird von van Slyke auf intermediäre Bildung von Diazokörpern zurückgeführt.

Die Untersuchung der Substanzen wurde in einer Mikro-Slyke-Apparatur ausgeführt. Sie bereitete einige Schwierigkeiten. Zunächst wurde versucht 1—2 ccm der unverdünnten Lösung zu analysieren. Aber die stark salzsaure Lösung wirkte so heftig auf das Nitrit ein, daß mehr Stickoxyde entwickelt wurden, als die Bürette fassen konnte. Auch, als die Lösung 1 : 1 mit Wasser verdünnt wurde, blieb die Gasentwicklung zu stark. Eine größere Verdünnung würde einen zu geringen Gehalt der Lösung an Substanz zur Folge haben. Als darum versucht wurde, eine größere Menge Substanz

12) Donald van Slyke, Journ. of Biol. Chem. 9, 192; 1911.

13) Abderhalden u. v. Slyke: Ztschr. f. physiol. Chemie Bd. 74, 505, 1911.

in Lösung zu bringen, nahm dieser Vorgang mehr Zeit in Anspruch, als im Interesse der Untersuchung zweckmäßig war. Schließlich wurde noch die Bürette, die zum Auffangen der entwickelten Gase dient, mit der alkalischen Permanganatlösung gefüllt, die in der Absorptionspipette alle Gase bis auf Stickstoff aufnimmt, aber die Stickoxyde wurden schneller entwickelt, als sie von der Permanganatlösung absorbiert werden konnten.

Es blieb noch übrig, die Lösungen zu neutralisieren. Würde man sie genau neutralisieren, dann würde das Fibroin koagulieren; auch in ganz schwach saurer Lösung würde dies eintreten, deshalb wurden die Lösungen bis zur schwach alkalischen Reaktion zu starker Natronlauge zugetropft. Wählte man eine $11^1/_2$—12 normale Natronlauge, dann brauchte man zum Neutralisieren von 5 ccm Lösung etwa 5—6 ccm Natronlauge, erhielt also eine ungefähr $1^0/_0$ige Lösung, die sich gut für die Mikroanalysen eignete. $1^0/_0$ige Lösungen von Aminosäuren z. B. Leuzin ergaben fast theoretische Werte bei den Versuchsanalysen. Durch Titration wurde die nötige Menge Natronlauge für jede Lösung ermittelt und darauf vorsichtig unter starker Kühlung, sodaß die Innentemperatur des Gefäßes 0^0 nicht überstieg, 5 ccm Lösung in die Natronlauge eingetropft. Durch diese Vorsicht sollte die spaltende Wirkung von Alkali auf Eiweiß vermieden werden.

Nachdem die Analysen der schwach alkalischen Lösungen genau nach den Angaben von van Slyke ausgeführt wurden, erfolgte nach Ablauf $^1/_2$ Stunde die Ablesung der entwickelten Stickstoffmenge, der Temperatur und des Druckes. Die aus den Reagenzien, also dem Eisessig und dem Natriumnitrit abgegebenen, verunreinigenden Gase wurden jeweils durch 3 blinde Versuche ermittelt. Das Mittel aus diesen wurde vom gefundenen Stickstoffvolumen abgezogen. Wie man aus der Reaktionsformel ersieht, wird die doppelte Menge Stickstoff erhalten, bezogen auf den Stickstoff der freien Aminogruppen. Der wahre Stickstoffgehalt der freien Aminogruppen in Milligrammen wird aus den gefundenen Werten nach Gattermannschen Tabellen berechnet. Da die verwendete Substanzmenge bekannt ist, läßt sich der Prozentgehalt des Aminostickstoffs im Hydrolysat berechnen.

Um festzustellen, ob sich die Konzentrationen im Laufe der Untersuchung durch Verdampfen änderten, wurden die gut ver-

schlossenen Kolben von Zeit zu Zeit gewogen; doch konnte während der Versuchsdauer kein in Rechnung zu stellender Betrag gefunden werden.

3. Teil: **Ergebnisse der Untersuchungsmethoden.**

a) Die Absorptionsspektren im Ultraviolett.

Im experimentellen Teil 2) ist das Methodische über die Absorption im Ultraviolett berichtet worden. Mit Hilfe der Henrischen Vergleichsmethode wurden die Spektren von nativem Fibroin und vom Fibroin nach Behandlung mit Resorcin und Ameisensäure photographiert.

Wie aus den Arbeiten von R. O. Herzog und seinen Mitarbeitern, sowie aus den Veröffentlichungen von E. Abderhalden[14]) und seinen Mitarbeitern hervorgeht, zeigen die aromatischen Aminosäuren eine selektive Absorption. Beim Fibroin würde also die selektive Absorption vom Tyrosin stammen. In alkalischer Lösung ist die Kurve des Tyrosins flacher als in netraler Lösung und verschiebt sich nach dem langwelligen Teil des Spektrums. Die Absorptionsbande der tyrosinhaltigen Eiweißkörper liegen nach E. Abderhalden stets bei $\nu = 3\,450 - 3\,700$.

Wie zu erwarten war, liegt beim nativen Fibroin, beim Ameisensäure-Fibroin-Präparat und beim Resorcin-Präparat eine selektive Absorption vor. Bei den ersten beiden Substanzen lag das Maximum bei $\nu = 3\,400 - 3\,450$, das Minimum bei $\nu = 3\,650 - 3\,700$. Die Werte für den Extinktionskoeffizienten E sind beim Fibroin im Maximum = 3,27; im Minimum = 3,03; beim Fibroin, das mit Ameisensäure behandelt worden war, wurde eine Doppelkurve gefunden für die Konzentrationen von 0,1 % und 0,01 %. Die Werte für E sind beim Maximum für die Konzentrationen 0,1 % = 3,31 und für die Konzentration 0,01 % = 3,24; beim Minimum für 0,1 %ige Lösung 3,05 und für 0,01 %ige Lösung 2,99. Sie liegen oberhalb und unterhalb der Werte für das Fibroin, und ihre Mittelwerte fallen mit diesen zusammen.

Während beim Resorcin-Präparat sich Maximum und Minimum bei den gleichen Schwingungszahlen befinden, weichen die Werte für den Extinktionskoeffizienten ab. E ist bei Maximum = 3,41 und beim Minimum 3,24.

14) E. Abderhalden u. R. Hans, Ztschr. f. physiol. Chem. Bd. 166 S. 78.

Es zeigte sich also eine Uebereinstimmung zwischen dem nativen Fibroin und dem Ameisensäurepräparat. Die abweichenden Werte des Resorcinpräparates waren vorauszusehen, da seine Lösung im Gegensatz zu den beiden anderen gelb gefärbt war. Es war eine Verschiebung nach dem langwelligen Teil des Spektrums zu erwarten, die aber nicht eingetreten war, es zeigte sich nur eine Aenderung des Extinktionskoeffizienten. Entscheidende Schlüsse könnten nur gezogen werden, wenn es gelungen wäre, die Lösung zu entfärben. Dies wurde versucht durch Adsorption, durch Oxydation und durch Reduktion. Bei der Adsorption ging zu gleicher Zeit mit dem Farbstoff auch das Eiweiß an die Tierkohle, was durch das Ausbleiben der Biuretreaktion in der farblosen Lösung nachgewiesen wurde.

Für die Reduktion kamen nur milde Mittel in Frage, da von starken Reduktionsmitteln auch die Eiweißstoffe angegriffen werden unter Bildung von Aldehyden und Ketonen.[15]) Es wurde eine 10 %ige Lösung von Natriumhyposulfit verwendet. Für die Reduktion von 100 ccm Lösung waren 48 ccm Reduktionslösung erforderlich. Die Fibroinlösung entfärbte sich zwar, aber zu gleicher Zeit trat infolge der sauren Reaktion teilweise Flockung ein, die durch Zugabe von Alkali rückgängig gemacht werden konnte unter gleichzeitigem Wiederauftreten der Gelbfärbung. Als versucht wurde, durch Zusatz einer bei 0° gesättigten Amoniumsulfatlösung eine größere Menge Fibroin auszusalzen, erhielt man nach dem gründlichen Auswaschen des Fibroins ein schwach gelb gefärbtes Präparat. In Lösung zeigte es aber die gleiche intensive Gelbfärbung wie vor der Reduktion. Ein Versuch, die Farbe mit schwacher Alkalilösung auszuwaschen, mißlang ebenfalls.

Bei der Oxydation mit Perhydrol wurde zwar die Farbe zerstört, aber auch die Eiweißstoffe werden hierbei stark verändert[16]). Endlich wurde noch versucht, für die Lösung ein Resorcinpräparat zu verwenden, das in Stickstoffatmosphäre hergestellt wurde und nur eine schwache kanariengelbe Farbe in festem Zustand hatte. Da eine 0,1 %ige Lösung und 0,01 %ige Lösung gebraucht wurde, konnte man erwarten, daß die Färbung sehr schwach sein würde und keine Kurvenverschiebung zur Folge hätte. Die Lösung zeigte

15) Otto Kestner: Chemie der Eiweißkörper, 4. Aufl. 1925 S. 61.
16) Otto Kestner: l. c. S. 59.

aber die gleiche intensive Goldfärbung wie die Lösung des in Anwesenheit von Luftsauerstoff hergestellten Präparates. Da es also nicht gelungen war, die Lösung zu entfärben, konnte nicht nachgewiesen werden, in welcher Weise die Verschiebung dem Einfluß des Resorcins zuzuschreiben sei, ob es sich um eine Verunreinigung oder eine Verbindung mit dem Fibroin handelte.

Die Daten für die Ultraviolettabsorption.

Bei der Untersuchung von nativem Fibroin wurde gefunden:

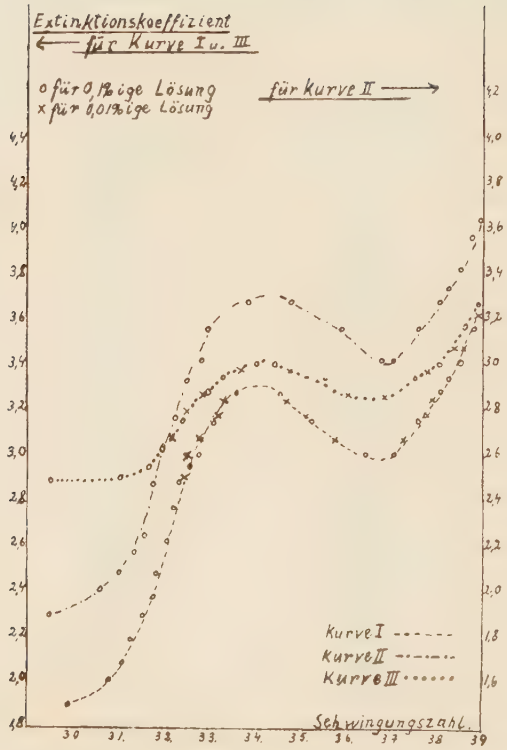
Für 0,1 %ige Lösung.		Für 0,01 %ige Lösung	
Schwingungszahl	lg Extinktionskoeffizient	Schwingungszahl	lg Extinktionskoeffizent
2824	1,60355	3164	2,60355
2993	1,90458	3256	2,90458
3089	2,01601	3256	3,01601
3011	2,08068	3282	3,08068
3124	2,08067	3584	3,08067
3134	2,19210	3736	3,08067
3160	2,25677	3323	3,19210
3185	2,38170	3548	3,19210
3181	2,49313	3788	3,19210
3216	2,63516	3339	3,25677
3236	2,77964	3473	3,25677
3249	2,89107	3793	3,25677
3267	2,95574	3837	3,38170
3280	3,03310	3851	3,49313
3648	3,03310	3896	3,63516
3708	3,03310	3937	3,77964
3317	3,17758	3912	3,89107
3535	3,17758	3952	3,95574
3761	3,17758	4010	4,03310
3368	3,28901		
3465	3,28901		
3808	3,28901		
3830	3,35368		
3858	3,43104		
3888	3,59004		
3923	3,65471		
3940	3,73207		
3971	3,79772		

Die Untersuchung des Fibroins nach 6 stündiger Vorbehandlung mit Ameisensäure ergab:

Für 0,1 %ige Lösung.		Für 0,01 %ige Lösung	
Schwingungs-zahl	lg Extinktions-koeffizient	Schwingungs-zahl	lg Extinktions-koeffizent
2747	1,60355	3256	2,60355
2956	1,90458	3294	2,90458
3066	2,01601	3283	3,01601
3103	2,08068	3667	3,01601
3113	2,08067	3745	3,01601
3141	2,19210	3335	3,08068
3161	2,25677	3592	3,08068
3145	2,38170	3774	3,08068
3183	2,49313	3323	3,08067
3208	2,63516	3624	3,08067
3234	2,77964	3767	3,08067
3259	2,95574	3410	3,19210
3280	3,03310	3513	3,19210
3680	3,03310	3815	3,19210
3710	3,03310	3867	3,25677
3291	3,17758	3897	3,49313
3596	3,17758	3903	3,63516
3763	3,17758		
3398	3,28901		
3484	3,28901		
3807	3,28901		
3831	3,35368		
3855	3,43104		
3870	3,59004		
3897	3,65471		
3923	3,73207		
3969	3,79772		

Die Daten für das Fibroin nach Vorbehandlung mit Resorcin sind:

Für 0,1 %ige Lösung.		Für 0,01 %ige Lösung	
Schwingungszahl	lg Extinktionskoeffizient	Schwingungszahl	lg Extinktionskoeffizient
2480	2,49313	2583	2,60355
2657	2,63516	2956	2,90458
2879	2,77964	3181	3,01601
3109	2,89107	3220	3,08067
3173	2,95574	3190	3,08067
3194	3,03310	3255	3,19210
3240	3,17758	3299	3,25677
3303	3,28901	3614	3,25677
3410	3,41100	3695	3,25677
3454	3,41100	3372	3,38170
3810	3,41100	3489	3,38170
3567	3,35368	3788	3,38170
3753	3,35368	3840	3,49313
3357	3,43104	3900	3,63516
3778	3,43104	3960	3,89107
3813	3,43104		
3867	3,59004		
3896	3,65471		
3919	3,73207		
3947	3,79772		
3354	3,35368		



b) Die Stickstoffverteilung von nativem Fibroin und allen Präparaten.

Mittels der Stickstoffverteilungsmethode nach Donald van Slyke, wie im experimentellen Teil 2 b diskutiert worden ist, wurde versucht festzustellen, ob durch die Behandlung des nativen Fibroins mit Resorcin, resp. Ameisensäure eine starke Veränderung des Seidenfibroins vor sich gegangen war. R. O. Herzog und Krahn [17]) hatten mittels der Stickstoffverteilung nach Harris und Osborne die Einwirkung des Phenols auf andere Gerüsteiweißstoffe untersucht und bei Gelatine und Keratin bei energischer Behandlung mit Phenol eine Abnahme des Aminostickstoffs gefunden. Die Verfasser erklären diese Abnahme mit der Bildung von Diketopiperazin-

17) R. O. Herzog u. Krahn, Hoppe-Seylers Ztschr. f. physiol. Chemie Bd. 134 S. 296.

ringen analog der Bildung der Diketopiperazine aus Polypeptiden bei gleicher Behandlung. Bei schonender Behandlung fanden die Autoren keine Abweichung im Aminostickstoff zwischen Ausgangsmaterial und den daraus gewonnenen Präparaten.

Beim Vergleich der Stickstoffverteilung des nativen Fibroins mit der Stickstoffverteilung der daraus gewonnenen Präparate wurde kein Unterschied außerhalb der Fehlergrenze gefunden. Auch das Tetrapeptid: Triglycylglycin, zeigte bei schonender Behandlung mit Resorcin keine Abweichung im Stickstoffwert.

Aus dieser Gleichheit der Stickstoffverteilung lassen sich bei so komplizierten Stoffen wie das Seidenfibroin keinesfalls Schlüsse über die strukturelle Identität der Präparate mit dem Fibroin ziehen; sie sagt lediglich aus, daß bei schonender Behandlung mit Resorcin oder Ameisensäure, resp. Resorcin und Ameisensäure, die Bausteine des Fibroins, in den daraus gewonnenen Präparaten, unverändert erhalten worden sind. Beim Tetrapeptid kann man auf Grund der Gleichheit der analytischen Daten die Identität vor und nach der Behandlung mit Resorcin für erwiesen halten.

Um einen leichten Vergleich, der aus der Stickstoffverteilung gewonnenen Werte zu ermöglichen, sind diese mit den dazu gehörigen Daten in Tabellen zusammengestellt. Tabelle 1 gibt den Hydrolysenverlauf von Seidenfibroin in 20%iger Salzsäure bei Siedetemperatur, Tabelle 2 die Zusammenstellung der Gesamtstickstoffwerte der verschiedenen Substanzen; Tabelle 3 die Aminostickstoffwerte nach vollständiger Hydrolyse; in Tabelle 4 sind die Amidstickstoffwerte angeführt, in Tabelle 5 die Huminstickstoffwerte und in Tabelle 6 eine Uebersicht über die gesamte Stickstoffverteilung bei allen Substanzen.

Analysenwerte zur Stickstoffverteilung.

1. Hydrolysenverlauf bei nativer Seide in 20%iger Salzsäure.

Dauer i. Std.	mg Seide	gefund. ccm N	Temp.	Druck	mg Amino-Stickst.	% Amino-Stickst.	% Aminostickst. % Gesamtstickst.
½	0,01812	2,53	20	749	0,001418	7,83	44,99
1½	0,01828	4,14	20	749	0,002305	12,64	71,96
5½	0,01067	2,78	20	749	0,001632	15,30	87,07
4	0,01111	2,91	20	749	0,001632	14,68	83,57
24	0,01012	2,79	21	753	0,001573	15,54	88,41
30	0,01104	2,99	21	753	0,001685	15,27	86,92

2. Gesamtstickstoff der Substanzen.

Makro-Kjeldahl-Bestimmungen.

Substanz	g-Substanz	verbr. ccm n/10-Säure	%-Stickstoff	im Mittel
Fibroin	0,2170	27,06	17,47	17,52 %
„	0,1972	24,73	17,57	17,52 %
Fibr. nach 1 std. Behdl.	0,2902	35,95	17,44	17,72 %
m. Ameisensäure	0,2115	26,75	17,81	17,72 %
Fibr. nach 6-std. Behdl.	0,3025	37,25	17,36	17,56 %
m. Ameisensäure	0,3001	37,80	17,76	17,56 %
Fibr. nach 1-std. Behdl.	0,2322	28,50	17,31	17,45 %
m. Resorcin u. 6-std. Behandl. mit Ameisens.	0,2488	30,50	17,68	17,45 %

Mikro-Dumas-Bestimmungen.

Substanz	mg-Substanz	Druck	Temp.	Vol.	% Stickstoff	im Mittel
Fibroin 20 Min	5,062	739,2	22,0	0,869	17,25	17,47 %
m. Resorcin behand.	5,645	749,6	19,5	0,864	17,59	17,47 %
Fibr.-Resorc.-	2,903	754,0	18,0	0,44002	17,24	17,37 %
Präparat 1 Std.	4,239	754,0	17,5	0,66052	17,53	17,37 %
Fibroin-Resorcin-	5,367	751,0	20,0	0,833	17,53	17,61 %
Präparat 6 Std.	4,839	757,0	19,0	0,74876	17,7	17,61 %
Fibroin-Resorcin-Ameisensäure	5,776	762,0	21,0	0,882	17,35	17,43 %
Präparat 1 Std.	4,240	761,0	22,0	0,7154	17,52	17,43 %

3. Aminostickstoff-Bestimmungen.

Substanz	g – Substanz	gefund. ccm. N.	Temp.	Druck	Amino-Stickst. mg.	% Amino-Stickst.	Gesamt-Stickst. %
Fibroin	0,014586	4,15	21	754	0,002304	15,79	17,52
Fibr.-Ameis.-S. 1 Std.	0,01753	4,91	23	755	0,002727	15,56	17,72
Fibr.-Ameis.-S. 6 Std.	0,014259	4,05	21	754	0,002277	15,96	17,56
Fibr.-Resorc. 20 Min.	0,02009	5,21	16	747	0,002894	15,41	17,47
Fibr.-Resorc. 1 Std.	0,01265	3,54	18	762	0,001989	15,73	17,37
Fibr.-Resorc. 6 Std.	0,01488	4,03	16	747	0,002301	15,46	17,61
Fibr.-Resorc.-Ameisensäure 1 Std.	0,01625	4,44	23	755	0,002464	15,24	17,43
Fibr.-Resorc.-Ameisensäure 6 Std.	0,01267	3,53	19	762	0,001967	15,52	17,49

4. Amidstickstoff-Bestimmungen.

Substanz	g-Substanz	ccm verbr. n/10-Säure	% Stick-stoff	% Gesamt-Stickst.
Fibroin	2,7860	7,3	0,46	17,52
Fibr.-Ameisens. 1 Std.	2,8912	7,2	0,35	17,72
Fibr.-Ameisens. 6 Std.	2,9049	7,2	0,34	17,56
Fibr.-Resorc. 20 Min.	2,8912	7,2	0,30	17,47
Fibr.-Resorc. 1 Std.	2,8784	7,3	0,357	17,37
Fibr.-Resorc. 6 Std.	2,8801	7,0	0,342	17,61
Fibr.-Resorc.-Ameis.-S. 1 Std.	2,8952	7,2	0,34	17,43
Fibr.-Resorc.-Ameis.-S. 1 Std.	2,8900	6,9	0,34	17,48

5. Huminstickstoff-Bestimmungen.

Substanz	g-Substanz	ccm verbr. n/10-Säure	% Stickstoff	% Gesamtstickst.
Fibroin	2,7860	39,15	1,84	17,52
Fibr.-Ameisens. 1 Std.	2,8912	38,1	1,85	17,72
Fibr.-Ameisens. 6 Std.	2,9049	39,2	1,87	17,56
Fibr.-Resorc. 20 Min.	2,8912	38,45	1,872	17,47
Fibr.-Resorc. 1 Std.	2,8784	38,2	1,868	17,37
Fibr.-Resorc. 6 Std.	2,8801	38,25	1,870	17,61
Fibr.-Resorc.-Ameisens. 1 Std.	2,8952	38,25	1,852	17,43
Fibr.-Resorc.-Ameisens. 6 Std.	2,8900	38,3	1,82	17,49

6. Uebersicht über die Stickstoffverteilung

Substanz	% Amino-Stickst.	% Amid-Stickst.	% Humi-Stickst.	% Gesamtstickstoff Analysenw.	% Gesamtstickstoff Summe a.d. Verteilung
Fibroin	15,79	0,465	1,84	17,52	18,09
Fibr.-Ameisens. 1 Std.	15,56	0,35	1,85	17,72	17,76
Fibr.-Ameisens. 6 Std.	15,96	0,34	1,87	17,56	18,17
Fibr.-Resorc. 20 Min.	15,41	0,31	1,87	17,47	17,59
Fibr.-Resorc. 1 Std.	15,73	0,36	1,87	17,37	17,96
Fibr.-Resorc. 6 Std.	15,46	0,34	1,87	17,61	17,87
Fibr.-Res.-Ameisens. 1 Std.	15,24	0,34	1,85	17,43	17,43
Fibr.-Res.-Am isens. 6 Std.	15,52	0,34	1,82	17,49	17,68

c) Die Aminostickstoff-Spaltgeschwindigkeit.

Der Verlauf der hydrolytischen Spaltung und seine Geschwindigkeit wurden beim Fibroin und den Fibroinpräparaten durch die Messung des Aminostickstoffs geprüft. Für die quantitative Bestimmung der NH_2-Gruppen sind mehrere Methoden vorhanden. Für den vorliegenden Zweck konnte nur das Verfahren von Donald van Slyke benutzt werden, welches erlaubt den Aminostickstoff schwach alkalischer Lösungen zu bestimmen; neutrale Lösungen konnten aber nicht verwendet werden, da in neutraler Lösung wie in schwach saurer das Fibroin und die daraus gewonnenen Präparate koagulieren. So wurden die Substanzen in 37 %iger Salzsäure gelöst und nach dem Eintragen in Natronlauge bis zur

schwach alkalischen Reaktion auf den Aminostickstoffgehalt geprüft, wie es ausführlich im 2. Abschnitt des experimentellen Teiles geschildert wurde.

Wie in der Einleitung schon hervorgehoben wurde, zeigte es sich, daß die Spaltungsgeschwindigkeit sowohl von der Temperatur, bei der die Hydrolyse stattfand, als auch von der Art der Vorbehandlung, nicht aber von der Dauer der Behandlung abhängig war. Wurde die Hydrolyse bei 0° ausgeführt, so konnte am Fibroin erst nach Ablauf von 70 Stunden eine Spaltung festgestellt werden, während an dem Seidenfibroin, das mit Resorcin 1 Stunde vorbehandelt worden war, erst nach $76^1/_2$ Stunden eine Spaltung beobachtet wurde. Der Grad der Hydrolyse war beim nativen Fibroin geringer: nämlich 1,25 %, beim Resorcin-Präparat: 4,84 % $\frac{\text{Amino-St.}}{\text{Gesamt-St.}}$. Beim Fibroin bewegten sich die Aminostickstoffwerte bis zum Ablauf von 165 Stunden zwischen 1,25 bis 1,82 %. Beim Resorcinpräparat erreichte die Hydrolyse bereits nach 148 Stunden einen Wert von 7,05 % $\frac{\text{Amino-St.}}{\text{Gesamt-St.}}$. Erst nach 568 Stunden war die Hydrolyse des Fibroins bis zu 6,05 % Aminostickstoff fortgeschritten, erreichte also nach ungefähr vierfacher Dauer nicht ganz den Hydrolysengrad des Resorcinpräparates.

Nahm man eine Spaltung bei 39° vor, so war beim Fibroin nach Ablauf von $2^1/_2$ Stunden noch keine Hydrolyse eingetreten, während bei dem mit Ameisensäure 1 Stunde lang vorbehandelten Fibroin 1,20 %, bei dem 6 Stunden lang vorbehandelten Fibroin 3,1 %; bei dem 20 Minuten-Resorcin-Präparat nach $1^1/_1$ Stunden bereits 2,1 %; beim 6-Stunden-Resorcin-Präparat nach $2^1/_2$ den 3,34 % gespalten waren und das mit Resorcin und Ameisensäure behandelte Fibroin eine noch höhere Spaltung erfuhr.

Nach 23 Stunden erreichte das Fibroin eine Spaltung von 4,99 % und zeigte eine Steigerung dieses Wertes nur innerhalb der Fehlergrenze - die Werte liegen zwischen 4,92—5,24 % — bis zur letzten Messung, die nach 291 Stunden vorgenommen wurde. — Die Ameisensäure-Fibroinpräparate zeigen eine weitergehende Hydrolyse: Das 1-Stunden-Präparat bleibt zwar 64 Stunden auf dem Stand, den es nach $2^1/_2$ Stunden erreicht hat, nach 98 Stunden

aber ist der Wert auf 8,22 % gestiegen, dieser Wert wird bis zum Abbruch der Messungen nach 169 Stunden nur innerhalb der Fehlergrenze überschritten. Obgleich das 6-Stundenpräparat höhere Anfangswerte zeigt, nämlich 3,09 % nach $2^1/_2$ Stunden; 4,61 % nach 46 Stunden, ist die Höhe, die es nach 98 Stunden erreicht = 8,02 % und beim Abbruch der Messungen nach 168 Stunden = 8,55 %, gleich dem Endwert des 1-Stunden-Präparates.

Die Resorcin-Fibroin-Präparate von 20 Minuten, 1 Stunde und 6 Stunden erreichte trotz einer abweichenden Geschwindigkeit des Verlaufes auch sehr ähnliche Endwerte. Die Spaltung des 20-Minuten-Präparates hat den Anfangswert von 2,1 %, nach 1^1 Stunden, den Zwischenwert von 12,48 % der bis zur letzten Messung nach 198 Stunden nur um etwa 1 % steigt. — Das 1-Stunden-Präparat erreicht über die Zwischenwerte 7,21 % nach 23 Stunden, 10,66 nach 46 Stunden, nach 141 Stunden Werte, die zwischen 11,57 bis 12,17 % variieren. Die Messungen wurden bis 200 Stunden festgesetzt. — Das 6-Stundenpräparat erreicht bereits nach 23 Stunden eine Spaltung von 12,56 % und bis zur letzten Messung nach 188 Stunden schwankten die Werte zwischen 12,56 bis 13,48 %.

Auch der Hydrolysenverlauf der Resorcin-Ameisensäure-Präparate zeigt, trotz abweichender Geschwindigkeit untereinander sehr ähnliche Endwerte, die aber wesentlich höher sind als bei den anderen Präparaten. Die Anfangswerte liegen beim 1-Stunden-Versuch bei 2,39 % und beim 6-Stundenversuch bei 2,40 %, nach 2 und $2^1/_2$ Stunden. Beim 1-Stundenversuch ist nach 44 Stunden eine Spaltung von 12,11 % erreicht, die nach 66 Stunden auf 14,57 % steigt und nach 167 Stunden 35 % erreicht. Beim 6-Stunden-Präparat sind die Zwischenwerte nach 26 Stunden 14,01 % und schon nach 112 Stunden wird eine Spaltung von 34,38 % erreicht, die sich bis zur letzten Messung nach 200 Stunden nur um 2,6 % erhöht, also nicht wesentlich über die Höhe der Spaltung des 1-Stunden-Präparates steigt.

Die Deutung der Zunahme der Hydrolysengeschwindigkeit nach der schonenden Behandlung mit Resorcin, Ameisenräure, bezw. beiden Agenzien ist ,im theoretischen Teil bereits geschehen. Die genauen Daten sind in den folgenden Tabellen und der Verlauf mittels graphischer Darstellung in den Kurven 4—13 angegeben.

1. Spaltung des Fibroins bei 0°.

6 g Fibroin wurden in 294 g 37 %iger Salzsäure bei 0° aufgelöst und im Eisschrank bei 0° aufbewahrt. Das Gewicht von 5 ccm = 5,8987 g; darin sind 0,11798 g Fibroin. Für jede Bestimmung werden 5 ccm mit 6,3 ccm Natronlauge versetzt. 1 ccm der neutralisierten Lösung enthält 0,01044 g Fibroin. 65 Stunden lang wurde kein Aminostickstoff entwickelt.

Dauer i. Std.	verwd. ccm. Lösg.	mm Fibr.	gefund. ccm N.	Temp.	Druck	mg Amino-Stickst.	% Amino-Stickst.	% Amino-N × 100 / Gesamt-N.
70	1,51	15,765	0,06	18	764	0,03468	0,22	1,25
94	1,52	15,87	0,08	21	767	0,04573	0,29	1,64
96	1,55	16,19	0,08	21	767	0,04573	0,28	1,61
115	1,60	14,70	0,07	21	752	0,03928	0,24	1,34
119½	1,52	15,87	0,06	21	752	0,03363	0,21	1,21
140	1,51	15,76	0,08	21	759	0,03525	0,29	1,63
145½	1,52	15,87	0,08	21	759	0,0425	0,29	1,58
165	1,50	15,66	0,09	22	754	0,05031	0,32	1,83
187	1,52	15,87	0,24	22	756	0,1345	0,85	4,72
212	1,51	15,76	0,24	22	756	0,1345	0,85	4,97
237	1,53	15,89	0,24	22	760	0,1352	0,85	4,83
307½	1,50	15,66	0,28	22	760	0,1578	1,01	5,73
400	1,50	15,66	0,27	20	753	0,1522	0,97	5,52
568	1,52	15,87	0,30	20	752	0,169	1,07	6,06

2. Spaltung des Fibroins nach 1-stündiger Behandlung mit Resorcin bei 0°

In 98 g 37 %iger Salzsäure wurden 2 g Präparat bei 0° gelöst und im Eisschrank bei 0° aufbewahrt. Gewicht von 5 ccm 5,9078 g; in 1 ccm Lösung sind 0,02396 g Substanz. Für jede Messung wurden 10 ccm Lösung mit 13 ccm Natronlauge versetzt. 1 ccm der neutralisierten Lösung enthält 0,010418 g Substanz. 72 Stunden lang wurde kein Aminostickstoff abgespalten.

Dauer i. Std.	verwd. ccm. Lösg.	mm Fibr.	gefund. ccm-N.	Temp.	Druck	mg Amino-Stickst.	% Amino-Stickst.	% Amino-N × 100 / Gesamt-N.
76½	1,54	16,043	0,24	22	761	0,1354	0,84	4,84
148	1,53	15,94	0,28	22	754	0,1981	1,24	7,06

3. Spaltung des Fibroins bei 39°.

8 g Substanz wurden in 392 g 37 %iger Salzsäure bei 0° gelöst und im Thermostaten bei 39° aufbewahrt. 5 ccm Lösung wiegen 5,8614 g. Für jede Messung wurden 10 ccm Lösung mit 13 ccm Natronlauge versetzt. In 1 ccm der schwach alkalischen Lösung sind 0,01011 g Seide vorhanden.

Dauer i. Std.	verwd. ccm Lösg.	mm Fibr.	gefund. ccm N.	Temp.	Druck	mg Amino-Stickst.	% Amino-Stickst.	% Amino-N. × 100 / Gesamt-N.
2½	1,52	16,36	—	20	759	0,0	0,0	0,0
23	1,54	15,56	0,24	22	760	0,1365	0,88	4,99
47	1,43	14,45	0,23	22	756	0,1289	0,89	5,08
49	1,52	15,36	0,24	22	756	0,1345	0,87	4,98
119	1,54	15,56	0,30	20	753	0,1691	1,09	5,58
168½	1,54	15,56	0,24	22	757	0,1347	0,87	4,93
291	1,52	15,36	0,25	19	752	0,1415	0,92	5,24

4. Spaltung des Fibroins nach 1-stündiger Behandlung mit Ameisensäure bei 39°.

4 g Substanz wurden in 196 g 37 %iger Salzsäure gelöst (bei 0°) und im Thermostaten bei 39° aufbewahrt. 5 ccm Lösung wiegen 5,7743 g. Es wurden für jede Messung 5 ccm Lösung mit 6 ccm Natronlauge schwach alkalisch gemacht. 1 ccm verdünnter Lösung enthält 0,0105 g Substanz.

Dauer i. Std.	verwd. ccm Lösg.	mm Fibr.	gefund. ccm-N.	Temp.	Druck	mg Amino-Stickst.	% Amino-Stickst.	% Amino-N. × 100 / Gesamt-N.
2½	1,52	15,95	0,06	22	752	0,03345	0,21	1,21
46	1,50	15,75	0,07	22	752	0,04025	0,26	1,47
64	1,50	15,75	0,07	21	748	0,039025	0,25	1,42
98	1,50	15,75	0,40	20	754	0,2258	1,43	8,23
124	1,51	15,85	0,42	22	756	0,2340	1,48	8,47
169	1,51	15,85	0,42	22	756	0,2340	1,48	8,47

5. Spaltung des Fibroins nach 6-stündiger Behandlung mit Ameisensäure bei 39°.

4 g Substanz wurden in 196 g 37 %iger Salzsäure bei 0° gelöst und bei 39° im Thermostaten aufbewahrt. 5 ccm Lösung

wiegen 5,7636 g. 5 ccm Lösung wurden für jede Messung mit 6 ccm Natronlauge schwach alkalisch gemacht. 1 ccm der analysierten Lösung enthielt 0,01052 g Substanz.

Dauer i. Std.	verwd. ccm-Lösg.	mm Fibr.	gefund. ccm-N.	Temp.	Druck	mg Amino-Stickst.	% Amino-Stickst.	% Amino-N. × 100 Gesamt-N.
22	1,52	15,92	0,15	22	752	0,08625	0,54	3,10
46	1,53	16,032	0,23	22	752	0,13225	0,83	4,61
64	1,50	15,715	0,26	21	748	0,1495	0,95	5,42
98	1,53	16,032	0,40	20	754	0,2258	1,41	8,03
125	1,50	15,716	0,42	22	756	0,2361	1,50	8,56
168	1,50	15,716	0,42	22	756	0,2361	1,50	8,56

6. Spaltung des Fibroins nach 20 Minuten langer Behandlung mit Resorcin bei 39°.

6 g Substanz wurden in 294 g 37 %iger Salzsäure bei 0° gelöst im Thermostaten bei 39° aufbewahrt. Das Gewicht von 10 ccm Lösung war 11,66 g; für jede Messung wurden 5 ccm Lösung mit 6,3 ccm Natronlauge versetzt. In 1 ccm dieser Lösung sind 0,010325 g Substanz.

Dauer i. Std.	verwd. ccm-Lösg.	mm Fibr.	gefund. ccm-N.	Temp.	Druck	mg Amino-Stickst.	% Amino-Stickst.	% Amino-N. × 100 Gesamt-N.
1¼	1,50	15,49	0,10	18	762	0,05735	0,3703	2,11
2½	1,51	15,59	0,09	19	762	0,05162	0,3311	1,88
23¼	1,50	15,476	0,47	20	769	0,2708	1,748	9,95
24¾	1,51	15,59	0,46	20	769	0,265	1,70	9,67
45½	1,51	15,59	0,59	20	773	0,3417	2,19	12,48
48½	1,49	15,28	0,56	20	773	0,3407	2,24	12,73
74¾	1,50	15,48	0,64	20	773	0,3713	2,398	13,64
94¼	1,50	15,48	0,64	19	767	0,3694	2,39	13,57
198¼	1,52	15,69	0,64	19	767	0,3694	2,354	13,37

7. Spaltung des Fibroins nach 1-stündiger Behandlung mit Resorcin bei 39°.

2 g Substanz wurden in 98 g 37 %iger Salzsäure gelöst (bei 0°) und bei 39° im Thermostaten gehalten. 5 ccm mit 6 ccm Natronlauge versetzt. 1 ccm dieser Lösung enthält 0,01054 g Substanz.

Dauer i.Std.	verwd. ccm-Lösg.	mm Fibr.	gefund. ccm-N	Temp.	Druck	mgAmino-Stickst.	%Amino-Stickst.	%Amino-N ×100 / Gesamt-N.
1	1,51	15,953	0,0	17	746	0,0	0,0	0,0
23	1,51	15,953	0,35	16	748	0,1998	1,25	7,21
46	1,48	16,00	0,52	16	747	0,29639	1,85	10,66
141	1,50	15,846	0,58	17	756	0,32565	2,05	11,83
168	1,51	15,953	0,58	19	760	0,3335	2,09	12,03
190	1,51	15,953	0,56	19	760	0,31995	2,01	11,57
200	1,51	15,953	0,59	20	760	0,3371	2,11	12,17

8. Spaltung des Fibroins nach 6-stündiger Behandlung mit Resorcin bei 39°.

6 g Substanz wurden in 294 g 37 %iger Salzsäure bei 0° gelöst und im Thermostaten bei 39° aufbewahrt. 10 ccm wiegen 11,667 g. Für jede Messung wurden 5 ccm mit 6,3 ccm Natronlauge versetzt. 1 ccm der schwach alkalischen Lösung enthält 0,010325 g Substanz.

Dauer i. Std.	verwd. ccm-Lösg.	min Fibr.	gefund. ccm-N	Temp	Druck	mgAmino-Stickst.	%Amino-Stickst.	%Amino-N ×100 / Gesamt-N.
½	1,52	15,69	0,0	20	769	0,0	0,0	0,0
2½	1,46	15,08	0,15	20	769	0,08643	0,59	3,34
4¼	1,51	15,58	0,41	20	769	0,2362	1,52	8,62
23¼	1,50	15,49	0,59	20	773	0,3417	2,21	12,56
26¾	1,50	15,49	0,61	20	773	0,3533	2,28	12,69
52½	1,52	15,69	0,61	20	773	0,3533	2,25	12,82
71½	1,50	15,49	0,59	19	767	0,3420	2,21	12,57
188	1,52	15,64	0,64	19	767	0,3709	2,36	13,48

9. Spaltung des Seidenfibroins nach 1-stündiger Behandlung mit Resorcin und 1-stündiger Behandlung mit Ameisensäure bei 39°.

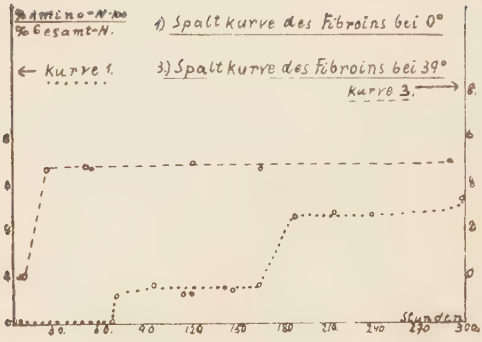
2,004 g Substanz wurden in 98 g 37 %iger Salzsäure bei 0° gelöst und bei 39° im Thermostaten aufbewahrt. Das Gewicht von 5 ccm Lösung ist 5,8355 g; für jede Messung wurden 5 ccm Lösung mit 6,7 ccm Natronlauge schwach alkalisch gemacht. In 1 ccm dieser Lösung sind 0,009977 g Substanz.

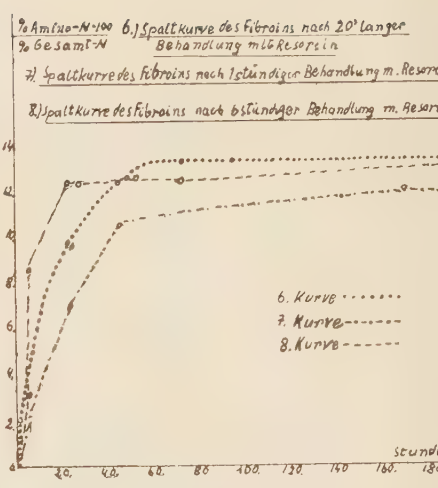
Dauer i. Std.	verwd. ccm-Lösg.	mm Fibr.	gefund. ccm-N.	Temp.	Druck	mg Amino-Stickst.	% Amino-Stickst.	% Amino-N. × 100 Gesamt-N.
½	1,50	14,964	0,0	19	758	0,0	0,0	0,0
15	1,50	14,964	0,16	19	758	0,09128	0,61	3,49
44	1,50	15,065	0,56	19	758	0,318	2,11	12,11
66	1,50	14,964	0,67	21	763	0,3810	2,54	14,57
140	1,50	14,964	0,67	21	763	0,381	2,54	14,57
167	1,52	15,16	1,71	21	766	0,9251	6,10	35,00
2	1,51	15,066	0,11	19	758	0,06276	0,41	2,39
200	1,50	14,964	1,68	21	763	0,9250	6,10	35,00

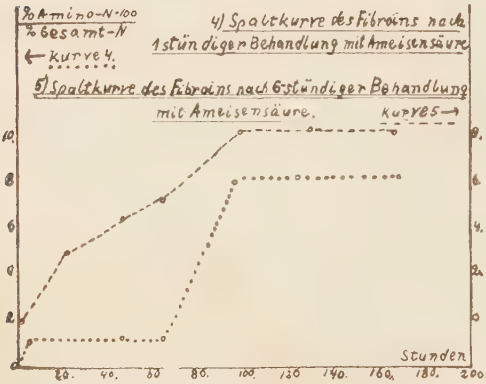
10. Spaltung des Fibroins nach 1-stündiger Behandlung mit Resorcin und nach 6-sündiger Behandlung mit Ameisensäure bei 39°.

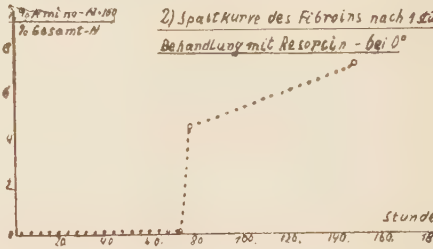
2,0028 g Substanz wurden in 98,05 g 37 %iger Salzsäure bei 0° gelöst und bei 39° im Thermostaten aufbewahrt. Das Gewicht von 5 ccm ist 5,8073 g. Für jede Bestimmung wurden 5 ccm Lösung mit 6,7 ccm Natronlauge schwach alkalisch gemacht. In 1 ccm dieser Lösung sind 0,009937 g Substanz.

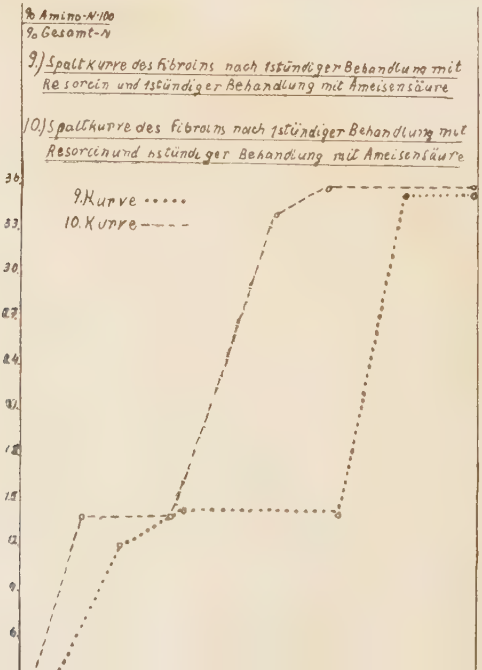
Dauer i. Std.	verwd. ccm-Lösg.	mm Fibr.	gefund. ccm- N.	Temp.	Druck	mg Amino-Stickst.	% Amino-Stickst.	% Amino-N. × 100 Gesamt-N.
2½	1,50	14,906	0,11	21	764	0,06264	0,42	2,40
26	1,50	14,906	0,66	21	761	0,37387	2,51	14,01
64	1,51	15,07	0,68	25	762	0,3773	2,56	14,38
112	1,50	14,905	1,62	20	752	0,9121	6,12	34,38
134	1,51	15,07	1,66	18	747	0,9374	6,24	35,98
200	1,50	14,905	1,68	18	760	0,9642	6,46	35,95


% Amino-N·100
% Gesamt-N.
1) Spaltkurve des Fibroins bei 0°
3) Spaltkurve des Fibroins bei 39°
← Kurve 1.
Kurve 3.
Stunden


% Amino-N·100
% Gesamt-N
6.) Spaltkurve des Fibroins nach 20° langer Behandlung mit Resorcin
7) Spaltkurve des Fibroins nach 1stündiger Behandlung m. Resorc
8) Spaltkurve des Fibroins nach 6stündiger Behandlung m. Resorc
6. Kurve
7. Kurve
8. Kurve


% Amino-N·100
% Gesamt-N
← Kurve 4.
4) Spaltkurve des Fibroins nach 1stündiger Behandlung mit Ameisensäure
5) Spaltkurve des Fibroins nach 6stündiger Behandlung mit Ameisensäure.
Kurve 5
Stunden


% Amino-N·100
% Gesamt-N
2) Spaltkurve des Fibroins nach 1 St
Behandlung mit Resopcin - bei 0°


% Amino-N·100
% Gesamt-N
9.) Spaltkurve des Fibroins nach 1stündiger Behandlung mit Resorcin und 1stündiger Behandlung mit Ameisensäure
10.) Spaltkurve des Fibroins nach 1stündiger Behandlung mit Resorcin und 6stündiger Behandlung mit Ameisensäure
9. Kurve
10. Kurve

4. Teil. **Farbreaktionen des nativen Fibroins und seiner Präparate.**

Das Fibroin selbst, sowie die aus ihm gewonnenen Präparate wurden den bekannten Eiweißfarbreaktionen [18]) unterzogen. Diese Farbreaktionen sind nicht dem Eiweiß als solchem eigentümlich, sondern kommen gewissen Atomgruppierungen innerhalb des Moleküls zu. Angewendet wurden die Reaktionen: 1) Biuret, 2) Xantoprotein, 3) Millon, 4) Ninhydrin, 5) Voisenet, 6. Molisch, 7) Pauly.

Die Biuretreaktion fiel bei den pulverförmigen Präparaten des Fibroins, die man durch Behandlung mit Resorcin resp. Resorcin und Ameisensäure erhielt, schon bei der Aufschlemmung dieser Substanzen in Wasser positiv aus; bei den faserförmigen Substanzen: also dem nativen Fibroin selbst und dem mit Ameisensäure behandelten Fibroin dagegen, erst nachdem diese in Salzsäure gelöst und mit Natronlauge bis zur alkalischen Reaktion versetzt worden waren. Der positive Verlauf der Reaktion im ersten Falle liegt an der spurenweisen Lösung der Präparate im Wasser, wie sie schon von R. O. Herzog und Kobel festgestellt wurde. Der negative Verlauf bei den faserförmigen Substanzen wird durch die Unlöslichkeit dieser im Wasser bedingt.

Bei allen Substanzen fielen positiv aus: die Biuret-, die Xantoprotein-, die Ninhydrin- und die Pauly-Reaktion. Die Reaktionen von Voisenet und Molisch fielen negativ aus.

Das positive Ergebnis der ersten Gruppe von Reaktionen war ebenso sicher zu erwarten wie das Ausbleiben der beiden letzten Reaktionen; weil die erste Gruppe nur die Anwesenheit von Aminosäuren anzeigt, die im Fibroin vorhanden sind, die zweite Gruppe dagegen die Abwesenheit von Kohlenhydraten resp. Aminosäuren, die im Fibroin nicht vorhanden sind.

18) Otto Kestner: l. c. S. 3.

Die Tabelle gibt eine übersichtliche Zusammenfassung der Befunde:

	Biuret	Xantoport.	Millon	Ninhydr.	Voisen.	Molisch	Pauly.
Albumin	+	+	+	+	—	—	+
Fibr. Res. Präp. 20 Min.	+	+	+	+	—	—	+
Fibr. Res. Präp. 1 Std.	+	+	+	+	—	—	+
Fibr. Res. Präp. 6 Std.	+	+	+	+	—	—	+
Fibroin	+	+	+	+	—	—	+
Fibr. Res. Ameis. Präp. 1 Std.	+	+	+	+	—	—	+
Fibr. Res. Ameis. Präp. 6 Std.	+	+	+	+	—	—	+
Fibr. Ameisens. Präp. 1 Std.	+	+	+	+	—	—	+
Fibr. Ameisens. Präp. 6 Std.	+	+	+	+	—	—	+

5. Teil. **Versuche mit Triglycylglycin zwecks eines Vergleiches mit dem Seidenfibroin.**

a) Darstellung des Tetrapeptids.

R. O. Herzog und Grzegorzewski [19]) hatten vor einigen Jahren gefunden, daß sich Peptide je nach Temperatur und Dauer der Einwirkung von Kresol in Anhydride und Diketopiperazine verwandeln lassen.

Zur Untersuchung der Wirkung von kurzfristiger Resorcinbehandlung auf Polypeptide wurde die Einwirkung auf ein Tetrapeptid gewählt: das Triglycylglycin.

Dieses Tetrapeptid wurde nach der durch Emil Fischer ausgearbeiteten Darstellungsweise gewonnen. Als Ausgangsmaterial diente Glykokollesterchlorhydrat, aus dem zunächst das Glycinanhydrid [20]) dargestellt wurde. Aus diesem wurde durch Abspaltung mit Natronlauge und Einführung der Chloracylgruppe das Chloracetylglycylglycin [21]) gewonnen, dieses durch Einwirkung von Ammoniak in das Tripeptid: Diglycylglycin [22]) verwandelt. Das Di-

19) R. O. Herzog und Krahn, Proteinstudien 2, Ztschr. f. physiol. Chemie Bd. 134.

20) Emil Fischer: Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine Bd. 2, 1907/19 S. 362.

21) E. Fischer: l. c. Bd. 2 S. 362.

22) E. Fischer: l. c. Bd. 1 S. 1899—1907 S. 327.

glycylglycin wurde wieder durch Behandlung mit Chloracetylchlorid in das Chloracetyldiglycylglycin [23]) übergeführt, aus dem endlich durch Einwirkung von Ammoniak das Triglycylglycin [24]) gewonnen wurde. Dieses zeigte zwar einen etwas zu tiefen Zersetzungspunkt — er lag nicht wie bei Fischer zwischen 220—270°, sondern zwischen 220—258° —, aber in den sonstigen analytischen Daten stimmte es mit dem Fischerschen Peptid überein. Der Stickstoffwert ist nach der Mikro-Dumas-Methode bestimmt und ergab 22,75 % und 22,95 % anstatt 22,76 %. Der C-H-Wert: C = 42,27 %; H = 5,55 % anstatt C — 42,28 %; H — 5,37 %. Die Einwage betrug 4,574 mg; CO_2 = 7,090 mg; H_2O = 2,216 mg.

b) Behandlung des Tetrapeptids mit Resorcin.

Das Tetrapeptid wurde ebenso wie das Fibroin bei 120° mit Resorcin unter Feuchtigkeitsausschluß eine Stunde lang bei 120° behandelt. Es löste sich in der Schmelze unter Braunfärbung. Durch Ausfällen mit Methylalkohol aus der heißen Schmelze, wie bei den Resorcinpräparaten des Fibroins, erhielt man ein rot gefärbtes Produkt, das einen geringeren Stickstoffwert zeigte als das Tetrapeptid. Durch wiederholtes Umfällen und Aufkochen mit Tierkohle konnte die färbende Substanz nicht entfernt werden. In der Lösung dieser Substanz konnte, wie bei den Fibroinpräparaten mittels Eisenchlorid oder Phthalsäureanhydrid, keine Spur Resorcin nachgewiesen werden. Auch hier kann entweder eine Verbindung zwischen Tetrapeptid und Resorcin vorliegen, oder ein Kondensationsprodukt des Resorcins, das in Alkohol und Aether nicht löslich, dagegen in Wasser löslich ist, sodaß es vom Tetrapeptid auf diese Weise nicht getrennt werden kann. Als versucht wurde, die Resorcinbehandlung im Stickstoffstrom auszuführen und erst nach dem Erkalten der Schmelze das Resorcin vom Tetrapeptid durch Extraktion mit Methanol zu trennen, erhielt man eine farblose Substanz, die in den Stickstoffwerten mit dem Tetrapeptid übereinstimmte und auch den gleichen Zersetzungspunkt zeigte. Während der Schmelze zeigte das Gemisch Resorcin-Tetrapeptid keine Färbung, und auch nach längerem Aufbewahren blieb das Re-

23) E. Fischer l. c. Bd. 1 S. 352.
24) E. Fischer l. c. Bd. 1 S. 353.

sorcinpräparat farblos, im Gegensatz zu dem Seidenfibroin, das in Stickstoffatmosphäre mit Resorcin behandelt wurde. Man kommt also zu dem Schluß, daß eine kurzfristige Einwirkung des Resorcins bei 120° in Stickstoffatmosphäre auf einfache Tetrapeptide keinerlei Einfluß hat.

Zusammenfassung.

In der vorliegenden Untersuchung sind Versuche angestellt worden zur Feststellung eines Einflusses von Resorcin, Ameisensäure resp. beider Agenzien auf natives Fibroin; zum Vergleich ist außerdem der Einfluß des Resorcins auf ein Polypeptid studiert worden.

1. Durch die Absorptionsmessungen im Ultraviolett konnte keine Entscheidung über den Einfluß von Resorcin auf Seidenfibroin getroffen werden, da durch Verfärbung der Lösung des Resorcin-Fibroin-Präparates bereits eine Verschiebung des Spektrums in sichtbarem Gebiete entstanden war. Das Spektrum des mit Ameisensäure behandelten Fibroins stimmte mit dem des nativen Fibroins gut überein, und eine Aenderung des Fibroins durch Ameisensäure war auf diesem Wege nicht festzustellen.

2. Mittels der Stickstoffverteilungsmethode wurde festgestellt, daß das Seidenfibroin vor und nach der Behandlung mit den vorhin angegebenen Reagenzien keinerlei Abweichung in seinem Gesamtstickstoffgehalt und in der Verteilung des Stickstoffs auf Amid-, Amino- und Humin-Stickstoff zeigte. Die einzelnen Bausteine sind also nach der Behandlung erhalten geblieben.

3. Die Verfolgung des Hydrolysenverlaufes beim Seidenfibroin und den Präparaten ergab eine bemerkenswerte Abweichung in der Geschwindigkeit der Angreifbarkeit durch Salzsäure. Beim nativen Fibroin war diese geringer als bei den Präparaten. Sie ging nicht von der Behandlungsdauer ab, sondern von dem angewendeten Quellungsmittel und kann als physikalische Einwirkung gedeutet werden, die eine Folge der Vorquellung mit den angeführten Agenzien ist.

4. Auf des Tetrapeptid, das Triglycylglycin, wirkte das Resorcin innerhalb der untersuchten Versuchsdauer und Temperatur nicht verändernd ein.

Die Arbeit wurde im Kaiser-Wilhelm-Institut für Faserstoffchemie in Berlin-Dahlem auf Anregung und unter Leitung des Herrn Prof. Dr. R. O. Herzog ausgeführt.

Es sei mir gestattet, an dieser Stelle Herrn Professor Herzog für seine Ratschläge meinen ergebenen Dank auszusprechen.

Lebenslauf.

Ich, Irene Weindling, wurde am 15. Januar 1903 als Tochter des Kaufmanns Stephan Weindling und seiner Ehefrau Gisela geb. Holzer zu Krakau in Polen geboren. Von meinem 6.—11. Lebensjahr besuchte ich dort die Elementarschule. Nach unserer Uebersiedlung nach Berlin besuchte ich zunächst das Apelsche Privatlyzeum, von Oktober 1920 ab die oberreale Westend-Schule, wo ich Ostern 1924 die Reifeprüfung bestand. Vom Sommersemester 1924 bis Wintersemester 1928/29 war ich an der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin immatrikuliert. Meine praktische Ausbildung in Chemie erhielt ich im I. Chemischen- und Physikalisch-chemischen Institut der Universität. — Von März 1928 bis April 1930 arbeitete ich im Kaiser-Wilhelm-Institut für Faserstoffchemie in Dahlem an meiner Dissertation.